取扱説明書

*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
*下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認のうえ操作して下さい。
http://metallogenics/

【測定原理】

o-Cresolphthalein Complexone（OCPC）はカルシウムと反応すると深紅色の複合体を形成します。この複合体の量はカルシウム濃度に比例するため、波長 570nm の吸光度を測定することによりカルシウム濃度を求めることができます。OCPC 法では検量線がシグモイド状になりやすい傾向がありますが、本キットでは、一点検量でも定量できるよう直線性が改善されました。

【カルシウム定量の意義】

カルシウムは体重の約 1.5-2.9%を占めており、骨格、軟組織の形成に重要な元素です。体内のカルシウムの 90%はハイドロキシアパタイトとして骨に存在し、1%が細胞内、0.1%が血中に存在しています。生理的機能としては細胞中の浸透圧調整、血液凝固、筋委縮、神経刺激、酵素の活性化などに関与しています。血中のカルシウムは 45%がアルブミン、グロブリンと結合しており、10%がリン酸塩、45%が遊離イオンです。血清カルシウムが低下すると、副甲状腺ホルモンが分泌され、骨吸収、腎臓での再吸収、活性型ビタミン D の生成に伴う小腸からのカルシウムの吸収が促進され、血清中の濃度が上昇します。血清中のカルシウム濃度が高くなると、甲状腺からカルシトニンが分泌され、骨吸収が抑制され、カルシウム濃度が低下します。このような機構により血清中での濃度は厳密に調節されており、正常値が狭いレンジ内に推移しています。低カルシウム血症としては、くる病、骨軟化症、テタニー、骨粗しょう症、動脈硬化を起こし、高カルシウム血症では抑うつ、意識障害、疲労感、知覚過敏、不整脈、高血圧などに関与することが知られています。

【キットの内容】

合計 250 測定分（商品コード CA30M）

R-A　Buffer　（緩衝液）	48 mL×1
R-B　Chelate Color（発色試液）	13 mL×1
Calcium Standard　10 mg/dL　（標準液）	1.4 mL×1

※ 商品コード CA31M（合計 500 測定分）は、上記 CA30M が 2 包装分含まれております。

【測定試料の注意点】

・EDTA は測定値に影響を与えるため試料採取時には使用しないでください。
・蓄尿は 10 倍以上希釈したものをアッセイ検体として下さい。
・酸抽出試料等はあらかじめ pH2 以上に調整したものを使用して下さい。
・ライセートなど懸濁している場合は遠心分離等により清澄化したものを使用して下さい。
・測定レンジ以上の高濃度の検体は適当に希釈したものをアッセイ検体としてください。
・本法は、その得られる数値を保証するものではありません。
　応用される際は最適パラメータを試料種ごとに検討の上、ご使用されることをお奨め致します。

【オペレーション】

1．試薬の準備　（用事調製）

R-A Buffer（緩衝液）：　　そのまま使用して下さい。
R-B Chelate Color（発色試液）：　そのまま使用して下さい。
Calcium Standard（標準液）　：　そのまま使用して下さい。
*開封後は冷暗所（2-8℃）に保存し、1ヶ月以内に使用して下さい。

2．試料の調製

更新・最新情報は弊社 website を参照してください。

◇血清・血漿

そのままアッセイ検体として下さい。

◇組織抽出液、ライセート、その他の試料

遠心分離により清澄化させ、そのままアッセイ検体とします。
組織片から酸抽出する場合、ライセート中の Ca の解離を促進させる場合においては以下の例を参考にアッセイ検体を調製して下さい。

(例)　塩酸、硝酸等を試料に添加し 0.01～0.5M 程度の酸試料とする。
（例：試料 1mL + 6M 塩酸 10 μL の希酸抽出液、組織片を 0.5M 塩酸溶解抽出　等）
↓
pH > 2 であることを確認しアッセイ検体とする。

*pH<2 であると発色反応が阻害される可能性があります。
強酸性の場合は水酸化ナトリウム等で中和して下さい。
*懸濁している場合は遠心分離による上清をアッセイ検体とする。

*パラメータは一例です。試料、目的に合わせて最適化して下さい。
*アッセイに適用できる検体は pH > 2 です。

3．アッセイと測定操作

プレートリーダー（紫外可視分光光度計）による定量（1 検体 245 µL 容量）

以下の用量で精製水（または生理食塩水）、標準液、試料をウエルへ分注し、R-A を添加後、5 分間静置します。次に R-B を添加し、5 分後に下記の測定条件でマイクロプレートリーダー（紫外可視分光光度計）により測定してください。

○アッセイ

添加する試薬・試料 (µL)	試薬ブランク	Ca 標準試料	試　料
精製水 or 生理食塩水	5	-	-
Ca Standard（標準液）	-	5	-
試　料	-	-	5
R-A　Buffer (緩衝液)	190	190	190
室温で 5 分間静置 ↓			
R-B Chelate Color (発色試液)	50	50	50
十分に混合し、室温 5 分間反応後、試薬ブランク検体を対照（ゼロ点）として所定波長の吸光度を測定			

*ピペッティングにより泡が発生しないように丁寧に混合してください。泡が発生した場合はプレートミキサー等により除去してください。プレートミキサーのみによる混合、撹拌では再現性不良が発生する場合があります。
*標準液の濃度はカットオフ値、目的に合わせて、選択してください。但し 30 mg/dL 以上の試料では 2 倍～10 倍希釈したものをアッセイ検体としてください.
*アッセイボリュームを変更する場合は上記割合でアッセイして下さい。

測定条件（マイクロプレートリーダー）

測光波長（主波長）	570 nm (吸収極大波長)
感度のある波長域	560～590 nm
測定温度	25～37℃
ウエル	96 穴ウエル or 分光測定用セル等
*補正波長（副波長）	540 nm or 650～700 nm

*紫外可視分光光度計を使用してキュベットで測定する場合、測定可能な検体数はマイクロプレートリーダー使用時と比較して少なくなります。ダウンサイズされた微量セルを使用することで 96 穴ウエルと同等の測定数を得ることも可能です。詳細については、弊社 website のサポート情報「紫外可視分光計　微量セル推奨品」を御参照下さい。微量セルはセルホルダーとのクリアランスの僅差による誤差、再現性の低下などが報告されています。使用時にはセルホルダーへ均一に装着されていることを十分に確認してください。
*懸濁試料の場合、主波長の吸光度から副波長の吸光度を差分した値を OD 値として濃度を算出することで、より一層の正確性を付与させることができます。*タンパク質低吸着タイプのウエルを使用してください。

○濃度の算出

$$\frac{OD_{試料}}{OD_{標準}} \times 10 = \text{Ca 濃度(mg/dL)}$$

標準液濃度

$OD_{試料}$：　試料の吸光度
$OD_{標準}$：　標準試料の吸光度
対照　：　試薬ブランク
*単位換算　mg/dL×0.25 = mmol/L

【主な仕様と性能】

感度	試薬ブランクを対照としてカルシウム標準液（10 mg/dL）を測定した時の吸光度は 0.5～1.0 の範囲内です。
同時再現性	同一検体を 5 回測定した時の CV は 5%以内です。
正確性	既知濃度の血清標準物質おける表示値との差は 15%以内です。 Arsenazo-III 法、Chrolophosphonazo-III 法、原子吸光光度法に対して良好な相関があります。
測定範囲	0.2～30 mg/dL
共存物質の参考許容範囲	5 mg/dL のマグネシウムによる測定値への影響は 5%以内です。

【品質保持期限と保存方法】

本品の品質保持期限は製造後 12 ヶ月です。（冷蔵 2～8℃）
開封後、冷暗所（2-8℃）で保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

【参考文献】

1) 金井正光, *臨床検査法提要, 改訂 32 版,* 金原出版,, 569(2005)
2) Harold, V. *Am. J. Clin. Pathol*, 45, 290-296(1966).
3) 高尾晶子他, *医学検査*, 55(12), 1312-1317(2006)

【製造販売業者】

メタロジェニクス 株式会社
千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ

※メタロアッセイ ™は、メタロジェニクス（株）の 試薬キットの名称です。

問い合わせ先
メタロジェニクス株式会社　営業部
〒260-0856　千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ
TEL :　043-227-6767
FAX :　043-227-6768
e-mail :　sales@metallogenics.com
URL:　http://metallogenics.com/

※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website のサポートコーナーで御確認下さい。
http://metallogenics.com/
※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではございません。あらかじめご了承下さい。
※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダー、紫外可視分光光度計を用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
※ 品質に関してのお問い合わせの際は、試薬キット包装袋に貼付の Lot No.を御確認の上、お問い合わせ下さい。
※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは、予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切に御使用下さい。
※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については、付属の製品安全データシート（MSDS）に従って下さい。